

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. März 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/19405 A2

(51) Internationale Patentklassifikation?: **A61K 47/48**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/09004**

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. September 2000 (14.09.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
199 44 971.6 14. September 1999 (14.09.1999) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **TRIDELTA BIO MEDICAL GMBH [DE/DE];**
Ortsstrasse 44 B, 07330 Unterloquitz (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BAHR, Michael, K. [DE/DE];** Am Schiesshaus 22, 99425 Weimar (DE). **BERKOV, Dimitri [DE/DE];** Karl-Liebkecht-Strasse 68, 07747 Jena (DE). **BUSKE, Norbert [DE/DE];** Eschenbachstrasse 4, 12437 Berlin (DE). **CLEMENT, Joachim [DE/DE];** Biberweg 24, 07749 Jena (DE). **GÖRNERT, Peter [DE/DE];** Judith-Auer-Strasse 11, 07747 Jena (DE). **HÖFFKEN, Klaus [DE/DE];** Am Horn

39, 99425 Weimar (DE). **KLICHE, Kay-Oliver [DE/DE];** Dorfstrasse 30, 07751 Zöllnitz (DE). **KOBER, Thomas [DE/DE];** Sigmaringer Strasse 30, 10713 Berlin (DE). **SCHNABELRAUCH, Matthias [DE/DE];** Ibrahimstrasse 3, 07745 Jena (DE). **VOGT, Sebastian [DE/DE];** Ziegenhainer Strasse 67, 07749 Jena (DE). **WAGNER, Kerstin [DE/DE];** Wanderslebsstrasse 7, 07745 Jena (DE). **GANSAU, Christian [DE/DE];** Spandauer Landstrasse 96, 16761 Nieder-Neuendorf (DE).

(74) Anwälte: **GÜLDE, Klaus, W. usw.;** Gulde Hengelhaupt Ziebig, Schützenstrasse 15-17, 10117 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.**

(84) Bestimmungsstaaten (regional): **ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: **MAGNETIC NANOPARTICLES HAVING BIOCHEMICAL ACTIVITY, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF AND THEIR USE**

(54) Bezeichnung: **MAGNETISCHE NANOTEILCHEN MIT BIOCHEMISCHER WIRKSAMKEIT UND VERFAHREN ZU IH-
RER HERSTELLUNG SOWIE IHRE VERWENDUNG**

(57) Abstract: The invention relates to magnetic nanoparticles, to the production thereof and to their use. The aim of the invention is to prepare nanoparticles which, also in the intracellular area of cells, can specifically bond to intracellular biomacromolecules so that a separation is made possible by the action of an external magnetic field. This is achieved by using magnetic nanoparticles which have a biochemical activity and which are comprised of a magnetic nuclear particle and of a shell layer that is fixed to the nuclear particle. The nanoparticles contain a compound of general formula **M - S - L - Z (I)**, whereby the binding sites between **S** and **L** and **L** and **Z** have covalently bound functional groups. **M** represents the magnetic nuclear particle, **S** represents a biocompatible substrate fixed to **M**, **L** represents a linker grouping, and **Z** represents a grouping, which is comprised of nucleic acids, peptides or proteins or of their derivatives, and which has at least one structure that is specifically capable of binding with a binding domain of an intracellular biomacromolecule.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung bezieht sich auf magnetische Nanoteilchen, ihre Herstellung sowie auf ihre Verwendung. Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung von Nanoteilchen, die spezifisch auch im intrazellulären Bereich von Zellen Bindungen an intrazelluläre Biomakromoleküle eingehen können, so daß durch Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes eine Separation möglich wird. Die Lösung erfolgt durch magnetische Nanoteilchen mit biochemischer Wirksamkeit, bestehend aus einem magnetischen Kernteilchen und einer am Kernteilchen fixierten Hüllschicht, enthaltend eine Verbindung der allgemeinen Formel **M - S - L - Z (I)**, wobei die Verknüpfungsstellen zwischen **S** und **L** und **L** und **Z** kovalent gebundene funktionelle Gruppen aufweisen und wobei **M** das magnetische Kernteilchen, **S** ein an **M** fixiertes, biokompatibles Substrat, **L** eine Linker-Gruppierung ist und **Z** eine Gruppierung, bestehend aus Nukleinsäuren, Peptiden oder Proteinen oder deren Derivate, die mindestens eine Struktur aufweist, die spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung befähigt ist, ist.

WO 01/19405 A2



Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

5

10

**Magnetische Nanoteilchen mit biochemischer
Wirksamkeit und Verfahren zu ihrer Herstellung
sowie ihre Verwendung**

15

Beschreibung

20

Die Erfindung bezieht sich auf magnetische Nanoteilchen, ihre Herstellung sowie auf ihre Verwendung gemäß den Oberbegriffen der Ansprüche 1, 9, 13, 17, 18, 19, 21 und 23 bis 25.

25

Krebserkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen. Immer mehr Menschen sterben insbesondere an Lungen-, Brust- und Prostatakrebs. Die Bekämpfung von Krebserkrankungen gehört darum gegenwärtig zu den vorrangigen Zielen der Medizin.

30

Zu den üblichen Behandlungsmethoden der Bekämpfung von metastasierenden Tumoren gehört neben der operativen Entfernung befallener Organe die Chemotherapie mit ihrem bekannten Nebenwirkungsprofil, da die Medikamente infolge ihrer unspezifischen Wirkung auch gesunde Zellen schädigen und zwar an den dafür empfänglichen Stellen des gesamten Körpers.

35

Neue Therapieansätze nutzen u. a. Immunreaktionen, indem einmal die körpereigenen Abwehrkräfte durch Botenstoffe oder Zytokine aktiviert werden und zum anderen Eiweißmoleküle und/oder monoklonale Antikörper die Tumorzellen vernichten.

40

5

Neuentwicklungen auf dem Gebiet der Tumorzellseparation benutzen bereits Teilchen mit magnetischem Kern, die mit biologisch aktiven Hüllsubstanzen modifiziert sind. Sogenanntes "drug targeting" mit an magnetische Mikrosphären gekoppelten Substanzen wie Doxorubicin oder anderen Zytostatika befinden sich in der Entwicklung.

15

Die auch bekannten "Microbeads" und "Dynabeads" werden schon für diagnostische Verfahren genutzt, indem die magnetischen Mikrosphären infolge biologischer Wechselwirkung an die Zellmembran maligner Zellen adsorbiert und anschließend magnetisch separiert werden. Da die Oberflächenstruktur der Zellmembran im allgemeinen unspezifisch ist, liegen die Separationsraten allerdings bei weniger als 80%. Das hat zur Folge, daß die Gefahr besteht, daß viele Krebszellen nicht separiert worden sind. Diese können weiterhin Metastasen bilden.

25

Die Separation zum Zwecke der Diagnose erfolgt dabei ausschließlich extrakorporal, d.h. die Flüssigkeit mit den zu separierenden Zellen wird in einem geeigneten Gefäß außerhalb des menschlichen Körpers behandelt. Nach der Separation kann die nun gereinigte Flüssigkeit wieder dem menschlichen Körper zugeführt werden.

30

Aufgrund der unvollständigen Abtrennung der malignen Zellen ist zu erwarten, daß dieses Verfahren nach einiger Zeit wiederholt werden muß. Da aber das Verfahren ohnehin kranke Personen sehr stark belastet, ist eine wiederholte Behandlung nur sehr begrenzt möglich.

35

In der DE 41 16 093 A1 ist ein Verfahren zur Gewinnung magnetischer Träger durch kontrollierte Modifizierung

5 der Oberfläche von magnetischen Teilchen beschrieben.
Nach diesem Verfahren werden magnetische Teilchen
beschrieben, die auch magnetische Flüssigkeiten zu
bilden in der Lage sind, die dadurch gekennzeichnet
sind, daß sie Heteropolyanionen und gesättigte oder
10 ungesättigte oberflächenaktive Mittel tragen. Diese
Oberflächenmodifizierung soll ermöglichen, daß
biologisch aktive Moleküle, unter anderem Antikörper,
an die Oberfläche der Teilchen gebunden werden können.
Die biologisch aktiven Moleküle werden hier über Thio-
15 Brücken an Polythiole gebunden. Unter anderem werden
hier als Linker-Substanzen Dicarbonsäuren und Hydroxy-
carbonsäuren sowie Dimerkaptostersteinsäure eingesetzt.
Diese Verbindungen sind in der Lage, aufgrund einer
Eisen-komplexierenden Gruppe an das magnetische
20 Teilchen zu binden.

Es hat sich gezeigt, daß diese magnetischen Teilchen,
die auf der Oberfläche biologisch aktive Moleküle
enthalten, nicht geeignet sind, in intrazelluläre Räume
einzudringen und dort mit Biomakromolekülen zu koppeln,
25 da sie keine ausreichende Biokompatibilität besitzen.

In der DE 196 24 426 A1 sind magnetische Flüssigkeiten
für den Transport von diagnostisch oder therapeutisch
wirksamen Substanzen beschrieben. Die magnetischen
30 Kernteilchen werden mit Polymeren umhüllt, die reaktive
Gruppen aufweisen, die zur kovalenten Bindung oder zum
Ionenaustausch befähigt sind. An diese durchaus
biokompatible Hülle, die unter anderem aus Dextran
bestehen kann, können neue oder zusätzliche
35 funktionelle Gruppen aufgebracht oder aktiviert werden,
z. B. Bersteinsäureanhydrid oder Chloressigsäure, an
die dann die diagnostisch oder therapeutisch wirksamen
Substanzen entweder über eine heteropolare oder eine

5 kovalente Bindung fixiert werden. Das an das
Magnetteilchen auf die beschriebene Weise gebundene
Pharmakon soll intravenös verabreichbar sein und
mittels eines magnetischen Hochgradientenfeldes im
Bereich eines Zielgebietes wie z. B. eines Tumores oder
10 einer entzündlichen Gewebsregion fixiert werden und
dort seine diagnostischen und therapeutischen Wirkungen
entfalten. Um diesen Transport im Magnetfeld zu
ermöglichen, ist hier eine hohe intravasale
Verfügbarkeit der Magnetteilchen erforderlich, deren
15 Partikelgröße mit 200-500 nm angegeben werden. Schon
aufgrund der Größe der Teilchen ist auch hier ein
Eindringen der Teilchen in intrazelluläre Räume nicht
möglich. Auch eine spezifische Bindung an intrazellu-
läre Biomakromoleküle ist mit diesen Teilchen nicht
20 durchführbar.

Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung von
Nanoteilchen, die spezifisch auch im intrazellulären
Bereich von Zellen Bindungen an intrazelluläre
25 Biomakromoleküle eingehen können, so daß durch
Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes eine Separation
möglich wird.

Die Lösung der Aufgabe erfolgt erfindungsgemäß mit den
30 kennzeichnenden Teilen der Ansprüche 1, 9, 13, 17, 18,
19, 21 und 23 bis 25.

Die erfindungsgemäßen magnetischen Nanoteilchen sind
vorteilhafterweise in der Lage durch die Zellmembranen
35 in intrazelluläre Räume einzudringen und dort mit
intrazellulären Biomakromolekülen zu interagieren.

Die magnetischen Nanoteilchen bestehen aus ferri- oder
ferromagnetischem Material und weisen biologisch aktive

5 und/oder therapeutisch wirksame Hüllschichten auf. Sie sind in der Lage, zum einen die Zellmembran der Zellen zu durchdringen und zum anderen im intrazellulären Bereich von malignen Zellen mit hoher Spezifität an dem dort befindlichen Targets anzudocken.

10 Die Größe der erfindungsgemäßen Nanoteilchen beträgt in der Regel 2 bis 100 nm. Die Nanoteilchen haben hinsichtlich des Vermögens der Durchdringung der Zellmembran und ihrer besseren Körperverträglichkeit hervorragende Eigenschaften. Obwohl sie wegen des
15 kleinen Volumens ein relativ geringes magnetisches Moment besitzen, führt die intrazelluläre Teilchenagglomeration aufgrund der Bindung an die intrazellulären Zielbiomakromoleküle zu einer
20 Konzentrationssteigerung mit Erhöhung des magnetischen Momentes der abzutrennenden malignen Zellen, was die magnetische Separation begünstigt.

25 Typische Kernmaterialien der erfindungsgemäßen Nanoteilchen sind Ferrite der allgemeinen Zusammensetzung $\text{MeO}_x\text{Fe}_2\text{O}_3$, wobei Me ein zweiwertiges Metall, wie Co, Mn oder Fe ist. Weitere geeignete Materialien sind $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, Reinelemente Co, Fe, Ni und Metallverbindungen, wie Carbide und Nitride.

30 Da das magnetische Moment von Cobalt und Eisen bis zu vierfach höher als das der Ferrite ist, sind diese Stoffe bei gleicher Teilchengröße und gleichen Magnetfeldern effektiver abzutrennen. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß die biologische Verträglichkeit
35 dieser Materialien geringer ist. Das kann ein Vorteil sein, wenn dadurch eine zusätzliche Schädigung von beispielsweise malignen Zellen erfolgt. Andererseits ist die Expositionszeit und Konzentration dieser Stoffe in gesunden Zellen zu begrenzen.

5

Das Zusammenspiel von biochemischen, medizinischen und physikalischen Eigenschaften erfordert die Herstellung von maßgeschneiderten magnetischen Kernmaterialien und Hüllschichten.

10

Erfindungsgemäß ermöglichen die magnetischen Nanoteilchen gemäß Anspruch 1 ein Durchdringen der Zellmembranen und das Interagieren der magnetischen Nanoteilchen mit intrazellulären Zielbiomakromolekülen.

15

Dazu ist es erforderlich, die magnetischen Nanoteilchen homogen in Körperflüssigkeiten zu verteilen, denn aggregierte Nanoteilchen sind nicht in der Lage, die Zellmembran zu durchdringen. Das setzt unter anderem eine genügend dicke Hüllschicht, die wenigstens in der Größenordnung des Radius der Kerne sein muß, und eine gute Biokompatibilität der Bestandteile der Hüllschicht voraus. Ladungsträger im Hüllmaterial, also ein höheres Zetapotential, können die Dispergierfähigkeit in der Körperflüssigkeit zusätzlich günstig beeinflussen.

20

25

Eine besonders günstige Applikationsform der magnetischen Nanoteilchen ist eine Dispersion gemäß Anspruch 9.

30

Eine homogene Verteilung der erfindungsgemäßen magnetischen Nanoteilchen kann durch Einstellung einer geringen Konzentration der Nanoteilchen-Dispersionen begünstigt werden. Höhere Konzentrationen entstehen dann allerdings im Innenraum der Zelle, wenn die Nanoteilchen durch spezifische Adsorption an Zielbiomakromoleküle im intrazellulären Bereich von Zellen konzentriert werden. Im Inneren der Zelle ist eine Teilchenagglomeration von Vorteil. Die Konzentrationssteigerung an magnetischen Nanoteilchen

35

5 erhöht das magnetische Moment in der zu separierenden Zelle.

Die Bildung der magnetischen Kernteilchen findet entweder in der wäßrigen oder organischen Phase über
10 Keimbildungs-/Kristallwachstumsprozesse statt. Die Herstellung in der wäßrigen Phase über chemische Fällungsmethoden hat mehrere Vorteile, zum einen bilden sich in einer ersten Stufe die unmodifizierten magnetischen Teilchen, diese können über pH-Einstellungen sowohl positive als auch negative
15 Ladungsvorzeichen erhalten. Erst in einer zweiten Stufe werden die Hüllmoleküle adsorbiert. Die Adsorptionseffektivität richtet sich nach dem Ladungsvorzeichen an der Oberfläche der magnetischen Kernteilchen. Es gilt die Regel, daß Hüllmoleküle mit negativ geladenen Molekülteilchen bevorzugt an Kernoberflächen mit positivem Ladungsvorzeichen adsorbieren. Dabei erfolgt meist eine ionische chemische Reaktion, wie z.B. zwischen
20 Carboxylverbindungen und Aminoverbindungen. Diese hat den Vorteil, daß die adsorbierten Hüllmoleküle einmal vollständig die Kernoberfläche bedecken und zum anderen fest auf dieser verankert sind.

30 Oft reicht eine koordinative Bindung des biokompatiblen Substrates S für eine feste Verankerung aus, wie das für Polysaccharide bekannt ist.

Die Herstellung von ferromagnetischen Metallkern-
35 teilchen erfolgt überwiegend durch Thermolyse der Metallcarbonyle in der organischen Phase. Dabei werden in der organischen Phase lösliche Tenside oder Polymere zugesetzt, die zur Stabilisierung dienen. In der ersten Reaktionsstufe werden dadurch Kernteilchen, die in der

5 organischen Phase homogen verteilt sind, gebildet. In
einem zweiten Reaktionsschritt erfolgt die Überführung
der Kernteilchen in eine wäßrige Trägerflüssigkeit.
Enthält die Hüllschicht modifizierte Aminosäuren, so
erfolgt die Überführung der Kernteilchen nach
10 weitgehender Entfernung des organischen Lösungsmittels
durch Zusatz von alkalischer wäßriger Träger-
flüssigkeit. Die Hüllschicht wird in das wasserlösliche
Salz der Aminosäure überführt, die die Dispergierung
der magnetischen Kernteilchen bewirkt. Anschließend
15 können über weitere Reaktionen die magnetischen
Nanoteilchen hergestellt werden.

Erfindungsgemäß enthalten die magnetischen Nanoteilchen
eine Verbindung der allgemeinen Formel $M - S - L - Z$
20 (I), wobei die Verknüpfungsstellen zwischen S und L und
L und Z kovalent gebundene funktionelle Gruppen
aufweisen und wobei

M das magnetisches Kernteilchen,
S ein an M fixiertes, biokompatibles Substrat,
25 L eine Linker-Gruppierung ist und
Z eine Gruppierung, bestehend aus Nukleinsäuren,
Peptiden oder Proteinen oder deren Derivate, die
mindestens eine Struktur aufweist, die spezifisch mit
einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakro-
30 molekuls zur Bindung befähigt ist, ist.

Die magnetischen Kernteilchen bestehen aus Magnetit,
Maghemit, Ferriten der allgemeinen Formel $MeO_xFe_2O_3$,
wobei Me ein zweiwertiges Metall, wie Cobalt, Mangan,
35 Eisen ist, oder aus Cobalt, Eisen, Nickel, Eisencarbid
oder Eisennitrid. Die Größe der Kernteilchen beträgt in
einer Weiterbildung der Erfindung 2-100 nm.

5 Das Substrat S wird in einer Ausführung der Erfindung durch die Verbindungen wie Poly- bzw. Oligosaccharide oder, deren Derivate wie Dextran, Carboxymethyl-Dextran, Stärke, Dialdehyd-Stärke, Chitin, Alginate, Zellulose, Carboxymethyl-Zellulose, Proteine oder deren Derivate
10 wie Albumine, Peptide, synthetische Polymere wie Polyethylenglykole, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenimin, Polymethacrylate, bifunktionelle Carbonsäuren und deren Derivate wie die Merkapto-bernsteinsäure oder Hydroxycarbonsäuren gebildet.

15 In einer weiteren Ausführung der Erfindung wird die Linker-Gruppierung L durch Umsetzung einer Verbindung wie Poly- und Dicarbonsäuren, Polyhydroxycarbonsäuren, Diamine, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Lipide,
20 Lipoproteine, Glykoproteine, Lektine, Oligosaccharide, Polysaccharide, Oligonukleotide und deren alkylierte Derivate und Nukleinsäuren (DNA, RNA, PNA) und deren alkylierte Derivate, entweder einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegend, die mindestens zwei gleiche
25 oder unterschiedliche funktionelle Gruppen enthält, gebildet.

In einer weiteren Ausführungsvariante der Erfindung sind beispielhaft die funktionellen Gruppen vorgesehen,
30 die als Verknüpfungsgruppierungen für das Substrat S, für die Linker-Gruppierung L und die Gruppierung Z erfindungsgemäß eingesetzt werden können. Wesentlich ist, daß die Verbindung (I) durch kovalente Bindungen gekennzeichnet ist.

35 Die biochemisch wirksame Verbindung der allgemeinen Formel S - L - Z (II) eignet sich hervorragend zur Herstellung der erfindungsgemäßen magnetischen Nanoteilchen.

5

10

Die Herstellung der magnetischen Nanoteilchen erfolgt stufenweise. Die magnetischen Kernteilchen werden auf an sich bekannte Weise hergestellt und in einer bevorzugten Variante unmittelbar mit der biochemisch wirksamen Verbindung (II) umgesetzt.

15

In einer weiteren Ausführung der Erfindung werden die erfindungsgemäßen magnetischen Kernteilchen nach folgendem Verfahren hergestellt:

20

- a. Herstellung der magnetischen Kernteilchen auf an sich bekannte Weise,
- b. Umsetzen der magnetischen Kernteilchen mit dem biokompatiblen Substrat S und
- c. Umsetzen der entstandenen Verbindung M - S mit einer Verbindung L - Z,

wobei

25

30

35

zur Herstellung von L - Z eine Verbindung wie Poly- und Dicarbonsäuren, Polyhydroxycarbonsäuren, Diamine, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Lipide, Lipoproteine, Glykoproteine, Lektine, Oligosaccharide, Polysaccharide, Oligonukleotide und deren alkylierte Derivate und Nukleinsäuren (DNA, RNA, PNA) und deren alkylierte Derivate, entweder einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegend, die mindestens zwei gleiche oder unterschiedliche funktionelle Gruppen enthält, mit Nukleinsäuren, Peptiden und/oder Proteinen bzw. deren Derivate, die mindestens eine funktionelle Gruppe aufweisen und die mindestens eine Struktur enthalten, die spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung befähigt ist, umgesetzt werden.

Zur Herstellung der biochemisch wirksamen Verbindung (II) wird so verfahren, daß erst die Verbindung L - Z

5 hergestellt wird und anschließend L - Z mit dem Substrat S umgesetzt wird.

Die erfindungsgemäßen Nanoteilchen lassen sich zur Separation von Zellen, zur Separation von malignen
10 Zellen und zur Separation von intrazellulären Biomakromolekülen verwenden. Als Angriffspunkte für eine Interaktion mit intrazellulären Biomakromolekülen sollen insbesondere auch die Fusionsregionen von Chromosomen als molekulare Marker dienen. Das können
15 z. B. erkrankungstypische molekulare Marker sein. Weiterhin können diese Fusionsregionen zu Fusionsgenen führen, die Fusions-Boten-Ribonukleinsäuren (Fusions-mRNA) und Fusionsproteine hervorbringen. Beispielgebend soll die Chronisch-Myeloische Leukämie (CML) genannt
20 werden. Bei der CML tritt ein Chromosomenrearrangement t(9;22)(q34;q11) auf, das sog. Philadelphia-Chromosom, das zum BCR/ABL-Genprodukt führt. Das heißt, in den Zellen mit dieser Chromosomenveränderung liegt ein Gen vor, das in keiner anderen Körperzelle vorkommt. Dieses
25 Gen wird in Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) umgeschrieben und führt zur Synthese des BCR/ABL-Proteins. Die BCR/ABL-mRNA und das BCR/ABL-Protein kommen nur in den Tumorzellen vor. Als Bindungsdomäne für die magnetischen Nanoteilchen kommt die BCR/ABL-mRNA in
30 Betracht. Die Z-Gruppierung der erfindungsgemäßen magnetischen Nanoteilchen soll mittels Nukleinsäure-Nukleinsäure-Wechselwirkung mit der komplementären Sequenz auf der mRNA interagieren, wobei die BCR/ABL-Fusionstelle in dieser Sequenz enthalten sein muß. Die
35 individualspezifische Sequenz um die Fusionsstelle ist vorher durch Labormethoden bestimmt worden. Die Interaktion soll im Zytoplasma der Tumorzellen stattfinden. Nach dem Andocken der magnetischen Nanoteilchen über die Z-Gruppierung an die

5 komplementäre Sequenz auf der BCR/ABL-mRNA ist die Tumorzelle markiert.

Weitere beispielhafte Krebserkrankungen sind nachfolgend genannt:

10

| Hämatologische Erkrankung | Chromosomenrearrangement (Fusionsgenprodukt) |
|---------------------------|---|
|---------------------------|---|

15

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Akute Lymphatische Leukämie (ALL) | t(9;22)(q34;q11) (BCR/ABL) |
| | t(1;19)(q23;p13) (E2A/PBX) |
| | t(8;14)(q24;q32) |
| | t(2;8)(p11;q24) |
| | t(8;22)(q24;q11) (MYC, IGH, IGK, IGL) |

20

| |
|---|
| t(4;11)(q21;q23) (MLL/AF2) |
| t(1;14)(p32;q11)del(1p32) (TAL1, TCRA) |

25

| | |
|---------------------------------|---|
| Akute Myeloische Leukämie (AML) | t(8;21)(q22;q22) (AML/ETO) |
| | t(15;17)(q21;q11) (PML/RARA) |
| | inv16(p13q22) t(16;16)(p13;q22) (MYH11/CBFB) |

30

| | |
|----------------------|--|
| Non-Hodgkin Lymphome | t(6;9)(p23;q34) (DEK/CAN) |
| | t(14;18)(q32;q21) (BCL2/IGH) |
| | t(8;14)(q24;q32) |
| | t(2;8)(p11;q24) |
| | t(8;22)(q24;q11) (MYC, IGH, IGK, IGL) |

35

| | |
|--------------|------------------------------|
| Ewing Sarkom | t(11;14)(q13;q32) (BCL1/IGH) |
| | t(3;14)(q27;q32) (BCL6/IGH) |
| | t(11;22)(q24;q12) (FLI1/EWS) |

40

Für diese Erkrankungen, die wiederum nur eine Auswahl der denkbaren zu therapierenden Krankheiten darstellen, kommt sinngemäß o.g. Vorgehen zur Anwendung. Es existiert jeweils eine krankheitstypische Basensequenz, die durch die folgenden Chromosomenlokalisationen eindeutig beschrieben ist. Entsprechend soll auch bei diesen Erkrankungen die Z-Gruppierung der magnetischen Nanoteilchen mittels Nukleinsäure-Nukleinsäure-Wechselwirkung mit der komplementären Sequenz (Bindungsdomäne) auf der mRNA interagieren. Die Menge aller exakten Basensequenzen für wiederum alle denkbaren Erkrankungen ist unendlich groß, allein für

45

5 die CML sind derzeit mehr als 10 Bruchregionen beschrieben, hierzu werden ständig neue beschrieben.

Die Erfindung weist verschiedene Vorteile auf. Zunächst hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäßen magnetischen Nanoteilchen in entsprechenden Zellkultur-
10 Untersuchungen eine hohe Bioverträglichkeit aufweisen. Hierdurch ist eine gefahrlose Applikation möglich, wobei ebenso eine rein extrakorporale Verwendung der Partikel im Rahmen der erfindungsgemäßen Anwendungen denkbar ist. Im Unterschied zu den existierenden
15 Separationsverfahren mittels Durchflußzytometrie (FACS) sowie Magnetseparation (MACS) bieten die erfindungsgemäßen magnetischen Nanoteilchen entscheidende Vorteile. Mit ihnen ist es möglich, in das
20 Innere der Zellen, das sogenannte Zytoplasma, vorzudringen und hier spezifisch eine Bindung von Biomakromolekülen mit entsprechenden Strukturen wie Bindungsdomänen von Nukleinsäuren herbeizuführen. Auch nach entsprechender Translation entstehende Proteine
25 sind als Zielbiomakromoleküle für die spezifische Bindung an die Gruppierung Z der allgemeinen Formel (I) ins Auge gefasst. Nach heutigem Kenntnisstand weisen alle bösartigen Erkrankungen ein verändertes Genom in der Zelle als Grundlage auf. Bei einer Reihe von
30 Krankheiten ist diese molekulare Grundlage bereits definiert. Die Fusion von existierenden Genen zu sogenannten Fusionsgenen führt zu einer individualspezifischen Veränderung der Basensequenz, die sowohl Spezifität im Hinblick auf die zugrunde
35 liegende Erkrankung als auch auf den jeweiligen Patienten besitzt. Im Rahmen dieses Vorgehens wird erfindungsgemäß zunächst mittels molekularer Diagnostik die veränderte genomische Struktur (Bindungsdomäne) als spezifischen Bindungspartner der Gruppierung Z in (I)

5 definiert. Im Gefolge hiervon wird die Gruppierung Z
als spezifischer Bindungspartner der Bindungsdomäne
synthetisiert und anschließend klinisch eingesetzt.
Weiterhin ist auszuführen, dass auch gesunde Zellen
definierte Basensequenzen besitzen, die als
10 Bindungsdomäne von Interesse sind. Als Beispiel hierzu
mögen embryonale Zellen dienen, die in jedem gesunden
Organismus vorhanden sind und als Prototyp einer
Zelltyp-spezifischen Genexpression eine gegenüber
adulten Zellen geänderte Basensequenz besitzen. Diese
15 Zellen können - ebenso wie maligne Zellen - als
Zielobjekte für eine Magnet-Separation intrazellulärer
Biomakromoleküle dienen, indem eine spezifische Bindung
der Gruppierung Z an intrazelluläre Nukleinsäuren
herbeigeführt wird. Somit wird klar, dass die
20 Separation maligner Zellen nur ein Beispiel von vielen
sein dürfte. Neben der Separation aus Blut kommt
selbstverständlich auch der Einsatz aller anderen
Körperflüssigkeiten wie Liquor, Lymphe, Urin, Speichel,
Sperma sowie dissoziierter Gewebe in Betracht.

25 Die erfindungsgemäße Verwendung der magnetischen
Nanoteilchen soll am Beispiel der chronisch-myeloischen
Leukämie nochmals ausführlicher dargelegt werden.

Seit langem ist bekannt, dass der chronisch-myeloischen
30 Leukämie eine spezifische Translokation zwischen
Chromosom 9 und 22 zugrunde liegt, welche als
Oberbegriff als Philadelphia-Chromosom bezeichnet
werden. Molekulare Analysen der letzten Jahre haben
jedoch ergeben, dass selbst bei einer Krankheit eine
35 Vielzahl von möglichen Bruchpunkten - sprich
verschiedenen Fusionsgenen - existiert, die beim
jeweiligen Patienten individuell definiert werden
müssen. Es ist somit nicht möglich, eine
Universalstrategie für jeden Patienten mit chronisch-

5 myeloischer Leukämie anzubieten, vielmehr muss im oben
beschriebenen Sinne zunächst die exakte Lokalisation
des Bruchpunktes (Bindungsdomäne) definiert werden. Die
Bruchpunkte sind vorteilhafterweise nach entsprechender
Charakterisierung spezifisch mit den erfindungsgemäßen
10 magnetischen Nanoteilchen anzugehen. Es können dann
gezielt Zellen des malignen Klons zunächst markiert und
später in gewünschter Weise separiert werden. Dieses
Vorgehen ist prinzipiell für sämtliche anderen
Erkrankungen möglich. Auch solide Tumoren wie das
15 Mammakarzinom oder das Dickdarmkarzinom werden
zunehmend in ihren molekularen Grundlagen verstanden.
Hierbei können hereditäre Formen von Brust- und
Darmkrebs gegenüber sporadischen Formen, die nach wie
vor die weit überwiegende Mehrzahl der Krankheitsfälle
20 ausmachen, abgegrenzt werden. Anhand der Expression
bestimmter Genmuster können hier die malignen Zellen
wiederum markiert werden und in gewünschter Form
isoliert werden. Hierbei ist prinzipiell sowohl die
Extraktion aus Flüssigkeiten wie auch aus Gewebe
25 denkbar. An dieser Stelle muss nochmal betont werden,
dass ein solch spezifisches Vorgehen bisher mit keinem
anderen magnetischen Nanoteilchen realisierbar ist und
eine völlig neuartige Anwendung der Bindung von
Magnetpartikeln an Biomakromoleküle darstellt.

30 Die Erfindung wird an Hand der folgenden Ausführungs-
beispiele näher erläutert.

Ausführungsbeispiele:

35 Beispiel 1

0,5 Mol $\text{FeCl}_2 \cdot x \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ und 1 Mol $\text{FeCl}_3 \cdot x \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ werden in
100 ml Wasser vollständig gelöst und unter Rühren mit
konzentriertem Ammoniumhydroxid versetzt bis ein pH-

5 Wert von 9 erreicht wird. Die schwarzen Teilchen in der
Dispersion werden magnetisch abgetrennt und die
überstehende Lösung abdekantiert. Danach wird die
Dispersion mit halbkonzentrierter HCl auf pH 1-4
gebracht, wobei die Teilchen umgeladen werden. Der
10 Prozeß wird wiederholt bis die Teilchen beginnen zu
redispersgieren. Danach wird zentrifugiert (5000-10000
g) und die überstehende partikelarme Lösung
abdekantiert. Der Rückstand wird wieder in HCl (3-10 N)
aufgenommen und der ganze Prozeß solange wiederholt bis
15 eine elektrische Leitfähigkeit von 20-500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ bei
einem pH-Wert von 4-5 erreicht wird oder aber der
Rückstand wird gegen HCl (3-10 N) dialysiert bis
ebenfalls diese Werte erreicht werden.
Die Sättigungspolarisation des gebildeten, stabilen
20 Magnetit/Maghemit-Sol beträgt maximal 6 mT.

Beispiel 2

0,5 Mol $\text{FeCl}_2 \cdot x \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ und 1 Mol $\text{FeCl}_3 \cdot x \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ werden in
100 ml Wasser vollständig gelöst und unter Rühren mit
25 konzentriertem Ammoniumhydroxid versetzt bis ein pH-
Wert von 9 erreicht wird. Die schwarzen Teilchen in der
Dispersion werden magnetisch abgetrennt und die
überstehende Lösung abdekantiert. Anschließend gibt man
unter Rühren einige Milliliter Wasserstoffperoxid
30 (30%ig) zu, wobei die Teilchen zu Maghemit oxidiert
werden. Danach werden die Teilchen durch Zugabe von
halbkonzentrierter HCl wie unter Beispiel 1 beschrieben
behandelt.
Die Sättigungspolarisation des gebildeten, stabilen
35 Maghemit-Sol beträgt maximal 6 mT.

Beispiel 3

Zu 100 ml des unter Beispiel 1 und 2 beschriebenen
Magnetit- und/oder Maghemit-Sols gibt man 6 g CM-

5 Dextran (DS 0,4-2) gelöst in 20 ml Wasser und erwärmt
die Mischung unter Rühren auf 40-80°C, vorrangig auf
50-60°C, für 30 min. Das dabei gebildete stabile Sol,
bestehend aus mit CM-Dextran beschichteten
Magnetit/Maghemit-Teilchen, wird anschließend durch
10 Dialyse gegen Wasser gereinigt.

Beispiel 4

Zu einer Lösung aus 0,6 g CM-Dextran (DS 0,4-2) in 25
ml Wasser werden unter Rühren bei 70°C 13,1 ml einer 1
15 M Fe(III)-chlorid-Lösung, in der 2,04 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
gelöst sind, langsam zugetropft. Danach wird das
Reaktionsgemisch durch Zugabe von verdünnter NaOH (2N)
auf pH 9-10 gebracht, anschließend mit verdünnter HCl
(2N) neutralisiert und für 2 h bei 70°C gerührt, wobei
20 der pH-Wert der Lösung durch weitere Zugabe von
verdünnter NaOH oder HCl auf einem Wert von etwa 6,5-
7,5 gehalten wird. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches
wird der unlösliche Anteil durch Zentrifugation
entfernt und die erhaltene magnetische Flüssigkeit
25 durch Dialyse gegen Wasser gereinigt.

Die Sättigungspolarisation der CM-Dextran
beschichteten Nanoteilchen beträgt maximal 6 mT.

Beispiel 5

30 Zu 100 ml des unter Beispiel 1 und 2 beschriebenen
Magnetit- und/oder Maghemit-Sols gibt man 2 g
Dimerkaptobernsteinsäure gelöst in 20 ml Wasser und
erwärmt die Mischung unter Rühren auf 70°C für 30 min.
Das dabei gebildete stabile Sol, bestehend aus mit
35 Dimerkaptobernsteinsäure beschichteten Magnetit/Maghe-
mit-Teilchen, wird anschließend durch Dialyse gegen
Wasser gereinigt. Die Sättigungspolarisation beträgt
1-8 mT, vorrangig 3-6 mT.

5 Beispiel 6

10 Zu 100 ml des unter Beispiel 1 und 2 beschriebenen
Magnetit- und/oder Maghemit-Sols gibt man 6 g bovines
Albumin gelöst in 100 ml Wasser und erwärmt die
Mischung unter Rühren auf 70°C, für 30 min. Das dabei
gebildete stabile Sol, bestehend aus mit Albumin
beschichteten Magnetit/Maghemit-Teilchen, wird
anschließend durch Dialyse gegen Wasser gereinigt.

15 Beispiel 7

15 100 ml der nach Beispiel 1 oder 2 hergestellten
Dispersion werden in einer alkalischen Lösung, die 7g
N-Oleoylsarkosin (Korantin SH von BASF) enthält,
vermischt und 30 Minuten bei 50-80°C, vorrangig bei
65°C, gerührt. Die Teilchen agglomerieren nach dem
20 Vermischen, stabilisieren sich aber wieder, wenn der
pH-Wert im Alkalischen, vorrangig zwischen 8 und 9,
gehalten wird. Die Teilchen fallen im Säuren aus,
redispersieren aber wieder im Alkalischen.

25 Beispiel 8

30 Zu 1 mg Bernsteinsäure gelöst in 10 ml Wasser gibt man
unter Rühren die äquimolare Menge eines wasserlöslichen
Carbodiimids (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbo-
diimid-hydrochlorid) und läßt für 30 min bei 5-10°C
rühren. Anschließend werden 10 µg eines amino-
funktionalisierten Oligonukleotids (5'-H₂N-
ACTGGCCGCTGAAGGGCTTCTGCGTCTCCA-OH-3') gelöst in 50 µl
Phosphat-Puffer (pH 7,0) zugegeben und das Gemisch für
24 h bei 5-10°C gehalten. Zur Abtrennung der
35 Nebenprodukte und nicht umgesetzter Ausgangsstoffe wird
gegen Wasser dialysiert und das Reaktionsprodukt
lyophilisiert.

5 Beispiel 9

10 Zu 10 µg des nach Beispiel 8 funktionalisierten Oligonukleotids, gelöst in 100 µl Phosphat-Puffer (pH 7,0), gibt man unter Rühren 20 µg eines wasserlöslichen Carbodiimids (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid) und hält für 30 min bei 5-10°C. Diese Lösung wird anschließend zu 200 mg Albumin, gelöst in 20 ml Phosphat-Puffer, gegeben und das Gemisch für 24 h bei 5-10°C gehalten. Zur Abtrennung der Nebenprodukte und nicht umgesetzter Ausgangsstoffe wird gegen Wasser dialysiert und das erhaltene Reaktionsprodukt lyophilisiert.

20 Beispiel 10

20 1 ml des unter Beispiel 1 und 2 beschriebenen Magnetit- und/oder Maghemit-Sols wird mit Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt und durch Zugabe von verdünnter NaOH auf pH 7 eingestellt. Anschließend gibt man 60 mg des nach 9 funktionalisierten Albumins, gelöst in 10 ml Phosphat-Puffer (pH 7,0), zu und erwärmt unter Rühren für etwa 30 min auf 40°C. Die dabei erhaltene magnetische Flüssigkeit wird anschließend zentrifugiert und die Lösung durch Dialyse gegen Wasser gereinigt.

30 Beispiel 11

30 Zu 10 µg des nach Beispiel 8 funktionalisierten Oligonukleotids, gelöst in 100 µl Phosphat-Puffer (pH 7,0), gibt man unter Rühren 20 µg eines wasserlöslichen Carbodiimids (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid) und hält für 30 min bei 5-10°C. Diese Lösung wird anschließend zu 10 ml der nach Beispiel 6 hergestellten und im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnten magnetischen Flüssigkeit gegeben, für

- 5 24 h bei 5-10°C gehalten und danach durch Dialyse gegen Wasser gereinigt.

Beispiel 12

- 10 1 ml der nach Beispiel 3 bzw. 4 hergestellten magnetischen Flüssigkeit wird mit Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt, mit 20 mg eines wasserlöslichen Carbodiimids (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid) versetzt und für etwa 30 min bei 5-10°C gerührt. Danach werden 10 mg eines Peptids (H-Ala-Ala-Ala-Ala-OH) zugegeben und das Gemisch für 24 h bei 5-10°C gehalten. Zur Abtrennung der Nebenprodukte und nicht umgesetzter Ausgangsstoffe wird gegen Wasser dialysiert.

20 Beispiel 13

- Zu 10 ml der nach Beispiel 12 beschriebenen Lösung gibt man 20 mg eines wasserlöslichen Carbodiimids (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid), läßt für 30 min bei 5-10°C rühren und versetzt mit 25 10 µg eines aminofunktionalisierten Oligonukleotids (siehe Beispiel 7) gelöst in 50 µl Phosphat-Puffer (pH 7,0). Das Gemisch wird dann für 24 h bei 5-10°C gehalten und anschließend gegen Wasser dialysiert.

5

Patentansprüche

10

1. Magnetische Nanoteilchen mit biochemischer Wirksamkeit, bestehend aus einem magnetischen Kernteilchen und einer am Kernteilchen fixierten Hüllschicht, dadurch gekennzeichnet, daß die magnetischen Nanoteilchen eine Verbindung der allgemeinen Formel

15



enthalten,

wobei

20

die Verknüpfungsstellen zwischen S und L und L und Z kovalent gebundene funktionelle Gruppen aufweisen

und wobei

25

M das magnetische Kernteilchen,

S ein an M fixiertes, biokompatibles Substrat,

L eine Linker-Gruppierung ist und

Z eine Gruppierung, bestehend aus Nukleinsäuren, Peptiden und/oder Proteinen oder deren Derivate, die mindestens eine Struktur aufweist, die spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung befähigt ist,

30

ist.

35

2. Magnetische Nanoteilchen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kernteilchen aus Magnetit, Maghemit, Ferriten der allgemeinen Formel $MeO_xFe_2O_3$, wobei Me ein

5 zweiwertiges Metall, wie Cobalt, Mangan oder Eisen
ist, oder aus Cobalt, Eisen, Nickel, Eisencarbid
oder Eisennitrid bestehen.

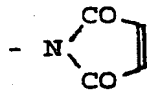
10 3. Magnetische Nanoteilchen nach einem der Ansprüche
1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Größe der Kernteilchen 2-100 nm beträgt.

15 4. Magnetische Nanoteilchen nach einem der Ansprüche
1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
das biokompatible Substrat S eine Verbindung wie
20 Poly- bzw. Oligosaccharide oder deren Derivate wie
Dextran, Carboxymethyl-Dextran, Stärke, Dialdehyd-
Stärke, Chitin, Alginate, Zellulose,
Carboxymethyl-Zellulose,
Proteine oder deren Derivate wie Albumine,
25 Peptide, synthetische Polymere wie Polyethylen-
glykole, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenimin,
Polymethacrylate, bifunktionelle Carbonsäuren und
deren Derivate wie die Merkaptobernsteinsäure oder
Hydroxycarbonsäuren ist.

30 5. Magnetische Nanoteilchen nach einem der Ansprüche
1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß
35 die Linker-Gruppierung L durch Umsetzung einer
Verbindung wie Poly- und Dicarbonsäuren,
Polyhydroxycarbonsäuren, Diamine, Aminosäuren,
Peptide, Proteine, Lipide, Lipoproteine,
Glykoproteine, Lektine, Oligosaccharide, Poly-

5 saccharide, Oligonukleotide und deren alkylierte
Derivate und Nukleinsäuren (DNA, RNA, PNA) und
deren alkylierte Derivate, entweder einzelsträngig
oder doppelsträngig vorliegend, die mindestens
10 zwei gleiche oder unterschiedliche funktionelle
Gruppen enthält, entstanden ist.

6. Magnetische Nanoteilchen nach einem der Ansprüche
1 bis 5,
15 dadurch gekennzeichnet, daß
die funktionellen Gruppen Gruppierungen wie -CHO,
-COOH, -NH₂, -SH, -NCS, -NCO, -OH, -COOR
wobei
20 R Alkyl-, Acyl- oder Aryl-Reste sind und



25 sind.

7. Magnetische Nanoteilchen nach einem der Ansprüche
1 bis 6,
30 dadurch gekennzeichnet, daß
S und M kovalent miteinander verbunden sind.

8. Magnetische Nanoteilchen nach einem der Ansprüche
35 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet, daß
zwischen M und S eine elektrostatische Bindung
ausgebildet ist.

5 9. Dispersion, bestehend aus magnetischen Nano-
 teilchen gemäß Anspruch 1 und einer
 Trägerflüssigkeit.

10 10. Dispersion nach Anspruch 9,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 die Trägerflüssigkeit polare und/oder nichtpolare
 Lösungsmittel enthält.

15 11. Dispersion nach Anspruch 9 oder 10,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 die Trägerflüssigkeit Wasser und/oder ein mit
 Wasser mischbares Lösungsmittel enthält.

20 12. Dispersion nach einem der Ansprüche 9 bis 11,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 physiologische Zusätze enthalten sind.

25 13. Biochemisch wirksame Verbindung der allgemeinen
 Formel

30 S - L - Z (II),

wobei

die Verknüpfungsstellen zwischen S und L und L und
Z kovalent verbundene funktionelle Gruppen
35 aufweisen

und wobei

S ein an M fixiertes, biokompatibles Substrat,

L eine biokompatible Linker-Gruppierung und

Z eine Gruppierung, bestehend aus Nuklein-
40 säuren, Peptiden und/oder Proteinen oder

5 deren Derivate, die mindestens eine Struktur
aufweist, die spezifisch mit einer Bindungs-
domäne eines intrazellulären Biomakromoleküls
zur Bindung befähigt ist,
10 ist.

14. Biochemisch wirksame Verbindung nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet, daß
15 das biokompatible Substrat S eine Verbindung wie
Poly- bzw. Oligosaccharide oder deren Derivate wie
Dextran, Carboxymethyl-Dextran, Stärke, Dialdehyd-
Stärke, Chitin, Alginate, Zellulose,
Carboxymethyl-Zellulose,
20 Proteine oder deren Derivate wie Albumine,
Peptide, synthetische Polymere wie Polyethylen-
glykole, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenimin,
Polymethacrylate, bifunktionelle Carbonsäuren und
deren Derivate wie die Merkaptobernsteinsäure oder
Hydroxycarbonsäuren ist.

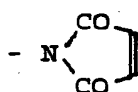
25 15. Biochemisch wirksame Verbindung nach Anspruch 13
oder 14,
dadurch gekennzeichnet, daß
30 die Linker-Gruppierung L durch Umsetzung einer
Verbindung wie Dicarbonsäuren, Diamine,
Aminosäuren, Peptide, Proteine, Lipide, Lipo-
proteine, Glykoproteine, Lektine, Oligosaccharide,
Polysaccharide, Oligonukleotide und deren
35 alkylierte Derivate und Nukleinsäuren (DNA, RNA,
PNA) und deren alkylierte Derivate, entweder
einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegend, die
mindestens zwei gleiche oder unterschiedliche
funktionelle Gruppen enthält, entstanden ist.

5

10

15

16. Biochemisch wirksame Verbindung nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die funktionellen Gruppen Gruppierungen wie -CHO, -COOH, -NH₂, -SH, -NCS, -NCO, -OH, -COOR und wobei R Alkyl-, Acyl- oder Aryl-Reste sind und



sind.

20

25

30

17. Verfahren zur Herstellung von magnetischen Nanoteilchen gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet durch die folgenden Verfahrensschritte
- a. Herstellung der magnetischen Kernteilchen auf an sich bekannte Weise,
 - b. Umsetzen der magnetischen Kernteilchen mit der Verbindung S - L - Z (II) zur Verbindung M - S - L - Z (I).

35

40

18. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet durch die folgenden Verfahrensschritte
- a. Herstellung der magnetischen Kernteilchen auf an sich bekannte Weise,
 - b. Umsetzen der magnetischen Kernteilchen mit dem biokompatiblen Substrat S und

5 c. Umsetzen der entstandenen Verbindung M - S
mit einer Verbindung L - Z,

wobei

zur Herstellung von L - Z eine Verbindung wie
Poly- und Dicarbonsäuren, Polyhydroxy-
10 carbonsäuren, Diamine, Aminosäuren, Peptide,
Proteine, Lipide, Lipoproteine,
Glykoproteine, Lektine, Oligosaccharide,
Polysaccharide, Oligonukleotide und deren
alkylierte Derivate und Nukleinsäuren (DNA,
15 RNA, PNA) und deren alkylierte Derivate,
entweder einzelsträngig oder doppelsträngig
vorliegend, die mindestens zwei gleiche oder
unterschiedliche funktionelle Gruppen
enthält,

20 mit Nukleinsäuren, Peptiden und/oder
Proteinen bzw. deren Derivate, die mindestens
eine funktionelle Gruppe aufweisen und
die mindestens eine Struktur enthalten, die
spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines
25 intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung
befähigt ist,
umgesetzt werden.

30 19. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der
allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1,
gekennzeichnet durch die folgenden Verfahrensschritte

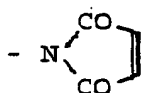
- 35 a. Herstellung der magnetischen Kernteilchen auf
an sich bekannte Weise,
b. Umsetzen der magnetischen Kernteilchen mit
dem biokompatiblen Substrat S,
c. Umsetzen der entstandenen Verbindung M - S
mit Verbindungen wie Poly- und Dicarbon-

säuren, Polyhydroxycarbonsäuren, Diamine, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Lipide, Lipoproteine, Glykoproteine, Lektine, Oligosaccharide, Polysaccharide, Oligonukleotide und deren alkylierte Derivate und Nukleinsäuren (DNA, RNA, PNA) und deren alkylierte Derivate, entweder einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegend, die mindestens zwei gleiche oder unterschiedliche funktionelle Gruppen enthält, und

d. Umsetzen der entstandenen Verbindung M - S - L mit Nukleinsäuren, Peptiden und/oder Proteinen bzw. deren Derivate, die mindestens eine funktionelle Gruppe aufweisen und

die mindestens eine Struktur enthalten, die spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung befähigt ist.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen S, L und Z über funktionelle Gruppen wie -CHO, -COOH, -NH₂, -SH, -NCS, -NCO, -OH, -COOR und wobei R Alkyl-, Acyl- oder Aryl-Reste sind und



verknüpft werden.

5

21. Verfahren zur Herstellung der biochemisch wirksamen Verbindung gemäß Anspruch 13, gekennzeichnet durch die folgenden Verfahrensschritte

10

- a. Herstellung der Verbindung L - Z,
- b. Umsetzen von L - Z mit dem biokompatiblen Substrat S

15

wobei

20

zur Herstellung von L - Z eine Verbindung wie Poly- und Dicarbonsäuren, Polyhydroxycarbonsäuren, Diamine, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Lipide, Lipoproteine, Glykoproteine, Lektine, Oligosaccharide, Polysaccharide, Oligonukleotide und deren alkylierte Derivate und Nukleinsäuren (DNA, RNA, PNA) und deren alkylierte Derivate, entweder einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegend, die mindestens zwei gleiche oder unterschiedliche funktionelle Gruppen enthält,

25

mit Nukleinsäuren, Peptiden und/oder Proteinen bzw. deren Derivate, die mindestens eine funktionelle Gruppe aufweisen und die mindestens eine Struktur enthalten, die spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung befähigt ist,

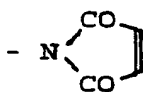
30

35

umgesetzt werden.

- 5 22. Verfahren nach Anspruch 21,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 die Verbindungen S, L und Z über funktionelle
 Gruppen wie -CHO, -COOH, -NH₂, -SH, -NCS, -NCO, -
 OH, -COOR und
10 wobei

R Alkyl-, Acyl- oder Aryl-Reste sind und



verknüpft werden.

- 20 23. Verwendung der magnetischen Nanoteilchen gemäß
 Anspruch 1 zur Separation von Zellen.
- 25 24. Verwendung der magnetischen Nanoteilchen gemäß
 Anspruch 1 zur Separation von malignen Zellen.
- 30 25. Verwendung der magnetischen Nanoteilchen gemäß
 Anspruch 1 zur Separation von intrazellulären
 Biomakromolekülen.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. März 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/19405 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 47/48**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/09004**

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. September 2000 (14.09.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
199 44 971.6 14. September 1999 (14.09.1999) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **BIOMEDICAL APHERESE SYSTEME GMBH**
[DE/DE]; Winzerlaer Strasse 2A, 07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BAHR, Michael**,
K. [DE/DE]; Am Schiesshaus 22, 99425 Weimar (DE).
BERKOV, Dimitri [DE/DE]; Karl-Liebknecht-Strasse
68, 07747 Jena (DE). **BUSKE, Norbert** [DE/DE]; Es-
chenbachstrasse 4, 12437 Berlin (DE). **CLEMENT**,
Joachim [DE/DE]; Biberweg 24, 07749 Jena (DE).
GÖRNERT, Peter [DE/DE]; Judith-Auer-Strasse 11,
07747 Jena (DE). **HÖFFKEN, Klaus** [DE/DE]; Am Horn

39, 99425 Weimar (DE). **KLICHE, Kay-Oliver** [DE/DE];
Dorfstrasse 30, 07751 Zöllnitz (DE). **KOBER, Thomas**
[DE/DE]; Sigmaringer Strasse 30, 10713 Berlin (DE).
SCHNABELRAUCH, Matthias [DE/DE]; Ibrahim-
strasse 3, 07745 Jena (DE). **VOGT, Sebastian** [DE/DE];
Ziegenhainer Strasse 67, 07749 Jena (DE). **WAGNER**,
Kerstin [DE/DE]; Wanderslebstrasse 7, 07745 Jena (DE).
GANSAU, Christian [DE/DE]; Spandauer Landstrasse
96, 16761 Nieder-Neuendorf (DE).

(74) Anwälte: **GULDE, Klaus, W. usw.**; Gulde Hengelhaupt
Ziebig, Schützenstrasse 15-17, 10117 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AG, AL, AM, AT,**
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): **ARIPO-Patent (GH,**
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: **MAGNETIC NANOPARTICLES HAVING BIOCHEMICAL ACTIVITY, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF AND THEIR USE**

(54) Bezeichnung: **MAGNETISCHE NANOTEILCHEN MIT BIOCHEMISCHER WIRKSAMKEIT UND VERFAHREN ZU IH-
RER HERSTELLUNG SOWIE IHRE VERWENDUNG**

(57) Abstract: The invention relates to magnetic nanoparticles, to the production thereof and to their use. The aim of the invention is to prepare nanoparticles which, also in the intracellular area of cells, can specifically bond to intracellular biomacromolecules so that a separation is made possible by the action of an external magnetic field. This is achieved by using magnetic nanoparticles which have a biochemical activity and which are comprised of a magnetic nuclear particle and of a shell layer that is fixed to the nuclear particle. The nanoparticles contain a compound of general formula **M - S - L - Z (I)**, whereby the binding sites between **S** and **L** and **L** and **Z** have covalently bound functional groups. **M** represents the magnetic nuclear particle, **S** represents a biocompatible substrate fixed to **M**, **L** represents a linker grouping, and **Z** represents a grouping, which is comprised of nucleic acids, peptides or proteins or of their derivatives, and which has at least one structure that is specifically capable of binding with a binding domain of an intracellular biomacromolecule.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung bezieht sich auf magnetische Nanoteilchen, ihre Herstellung sowie auf ihre Verwendung. Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung von Nanoteilchen, die spezifisch auch im intrazellulären Bereich von Zellen Bindungen an intrazelluläre Biomakromoleküle eingehen können, so daß durch Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes eine Separation möglich wird. Die Lösung erfolgt durch magnetische Nanoteilchen mit biochemischer Wirksamkeit, bestehend aus einem magnetischen Kernteilchen und einer am Kernteilchen fixierten Hüllschicht, enthaltend eine Verbindung der allgemeinen Formel **M - S - L - Z (I)**, wobei die Verknüpfungsstellen zwischen **S** und **L** und **L** und **Z** kovalent gebundene funktionelle Gruppen aufweisen und wobei **M** das magnetische Kernteilchen, **S** ein an **M** fixiertes, biokompatibles Substrat, **L** eine Linker-Gruppierung ist und **Z** eine Gruppierung, bestehend aus Nukleinsäuren, Peptiden oder Proteinen oder deren Derivate, die mindestens eine Struktur aufweist, die spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung befähigt ist, ist.

WO 01/19405 A3



Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

11. April 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/09004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EMBASE, BIOBASE, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| P.X | DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; SHI, KEYU ET AL: "Magnetic drug delivery system - adriamycin-carboxymethyl dextran magnetic nanoparticles" retrieved from STN Database accession no. 133:140083 XP002183998 abstract & SHENGWU YIXUE GONGCHENGXUE ZAZHI (2000), 17(1), 21-24 , | 1-25 |
| E | WO 00 56288 A (ACROSS BARRIERS GES FUER NEUE ;INST NEUE MAT GEMEIN GMBH (DE); KNE) 28 September 2000 (2000-09-28) claims --- -/- | 1 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *I* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 November 2001

Date of mailing of the international search report

13/12/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/09004

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | <p>MYKHAYLYK, O. ET AL: "Glial brain tumor targeting of magnetite nanoparticles in rats"</p> <p>J. MAGN. MAGN. MATER. (2001), 225(1-2), 241-247 ,</p> <p>XP001041592</p> <p>abstract</p> | 1-25 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/09004

Additional matter PCT/ISA/210

Continuation of Field I.2

Relevant Patent Claims Nos. 1-25 relate to an excessively large number of possible compounds or products. In fact, they comprise so many alternatives that they appear, in the given context, unclear (and/or too lengthy) under the terms of PCT Article 6 as if they enabled a meaningful search. For this reason, the search was directed at the portions of the patent claims which can be regarded as clear (and/or concise), namely these compounds or products were searched, e.g. those cited in the examples, including closely-related homologous compounds that are cited in the description.

The applicant is therefore advised that patent claims or sections of patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). Similar to the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO also does not generally carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the case when the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19), or in the case when the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/09004

| Patent document cited in search report | | Publication date | | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----|----------------------------|---------------------|
| WO 0056288 | A | 28-09-2000 | DE | 19912502 A1 | 21-09-2000 |
| | | | WO | 0056288 A1 | 28-09-2000 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte.ionales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09004

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| P, X | DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; SHI, KEYU ET AL: "Magnetic drug delivery system - adriamycin-carboxymethyl dextran magnetic nanoparticles" retrieved from STN Database accession no. 133:140083 XP002183998 Zusammenfassung & SHENGWU YIXUE GONGCHENGXUE ZAZHI (2000), 17(1), 21-24 , | 1-25 |
| E | WO 00 56288 A (ACROSS BARRIERS GES FUER NEUE ;INST NEUE MAT GEMEIN GMBH (DE); KNE) 28. September 2000 (2000-09-28) Ansprüche -/- | 1 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

g Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. November 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

13/12/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Berte, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | <p>MYKHAYLYK, O. ET AL: "Glial brain tumor targeting of magnetite nanoparticles in rats"</p> <p>J. MAGN. MAGN. MATER. (2001), 225(1-2), 241-247 ,</p> <p>XP001041592</p> <p>Zusammenfassung -----</p> | 1-25 |

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 1-25 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen oder Produkte. In der Tat umfassen sie so viele Wahlmöglichkeiten, daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar (und/oder zu weitläufig gefasst) erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichen. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, die als klar (und/oder knapp gefaßt) gelten können, nämlich diese Verbindungen oder Produkte recherchiert wurden, z.B. die in den Ausführungsbeispielen angegeben sind, einschliesslich nahverwandter homologer Verbindungen die in die Beschreibung angegebn sind.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09004

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | | Datum der Veröffentlichung |
|--|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------|-------------------------------|
| WO 0056288 | A | 28-09-2000 | DE | 19912502 A1 | 21-09-2000 |
| | | | WO | 0056288 A1 | 28-09-2000 |